

Comparison of the Antimicrobial Effect of Pomegranate Seed Extract with MI Fluoride Varnish and Their Synergistic Effects against Cariogenic Bacteria (*Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus*)-an in-Vitro Study

Azam Nahvi^{1,2}
Hamid Reza Goli³
Ali Davoodi⁴
Ali Jafari⁵
Abolfazl Hosseinnataj⁶
Fatemeh Golkar⁵
Banafsheh Soleimani⁷

¹ Dental Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Associate Professor, Department of Pediatric Dentistry, Faculty of Dentistry, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Associate Professor, Department of Medical Microbiology and Virology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Assistant Professor, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ Dentist, Sari, Iran

⁶ Assistant Professor, Department of Biostatistics and Epidemiology, Faculty of Health, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁷ Pediatric Dentist, Sari, Iran

(Received June 6, 2023, 2023; Accepted November 8, 2023, 2023)

Abstract

Background and purpose: The antibacterial properties of pomegranate have been investigated in numerous studies. The aim of this study was to compare the antimicrobial effect of pomegranate seed extract (PSE) with Minimally Invasive (MI) fluoride varnish and also to investigate their synergistic effect on the caries-causing bacteria *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus* bacteria.

Materials and methods: In this in-vitro study, the antibacterial properties and the minimum inhibitory and bactericidal concentrations (MIC and MBC, respectively) of the compounds were investigated using the disk agar diffusion test (growth inhibition halo) and the micro broth dilution test. The antibacterial activity of the methanolic extracts was studied in 5 groups: PSE, PSE and varnish, MI varnish, positive control (ampicillin and erythromycin) and negative control (sterile physiological serum). The data were analyzed using SPSS ver22 software.

Results: The largest diameter of growth inhibition in *S. mutans* and *L. acidophilus* was observed in the combination of two extracts ($12\pm 0.22\text{mm}$) and varnish ($12\pm 1.22\text{mm}$), respectively, while the smallest diameters were recorded in PSE ($8.0\pm 1.0\text{mm}$ and $4.0\pm 1.5\text{mm}$, respectively). Varnish showed the lowest MICs and MBCs for both types of bacteria tested. PSE and varnish showed similar results in inhibiting the growth of *S. mutans* ($P=0.588$); however, the simultaneous use of two extracts showed significant synergistic effects ($P<0.05$).

Conclusion: The MI varnish has a more favorable effect than the other groups studied, and a lower concentration is required to inhibit the growth of two bacterial species. However, high concentrations of PSE, with and without fluoride varnish, can be used against *Streptococcus mutans*.

Keywords: Fluoride varnish, *Lactobacillus acidophilus*, Pomegranate seed extract, *Punica granatum*, *Streptococcus mutans*

J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 33 (Supple 2): 139-150 (Persian).

Corresponding Author: Banafsheh Soleimani– Faculty of Dentistry, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.
(E-mail: banafsheh.soleimani@yahoo.com)

مقایسه اثر ضد میکروبی عصاره دانه انار با وارنیش فلوراید MI و اثرهای سینرژیسیم آن ها بر باکتری های پوسیدگی زای دندان (استرپتوکوکوس موتانس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس) در شرایط آزمایشگاهی

اعظم نحوی^۱حمیدرضا گلی^۳علی داوودی^۴علی جعفری^۵ابوالفضل حسین نتاج^۶فاطمه گل کار^۵بنفشه سلیمانی^۷

چکیده

سابقه و هدف: خواص ضد باکتریایی انار در مطالعات متعددی بررسی شده است. هدف از این مطالعه مقایسه اثر ضد میکروبی عصاره دانه انار (PSE: Pomegranate Seed Extract) با وارنیش فلوراید MI و نیز بررسی اثر سینرژیسیم آن ها بر باکتری های پوسیدگی زای دهانی استرپتوکوکوس موتانس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بود.

مواد و روش ها: در این مطالعه *in-vitro* از تست های دیسک آگار دیفیوژن (قطر هاله عدم رشد) و میکروبراث دایلوژن برای بررسی خواص ضد باکتریایی و حداقل غلظت مهاری (MIC) و کشندگی (MBC) ترکیبات استفاده شد. فعالیت ضد باکتریایی عصاره های متانولی در ۵ گروه PSE، PSE و وارنیش، وارنیش MI، کنترل مثبت (آمی سیلین و اریتروماسین) و کنترل منفی (سرم فیزیولوژیک استریل) بررسی شد. داده ها با نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ تحلیل شدند.

یافته ها: بیشترین قطر هاله مهار رشد در استرپتوکوکوس موتانس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به ترتیب در ترکیب دو عصاره ((mm) ۱۲/۰±۰/۲۲) و وارنیش ((mm) ۱۲/۱±۰/۲۲) بود و نیز کمترین قطر هاله ها در PSE به ثبت رسید (به ترتیب ((mm) ۸/۱±۰/۰) و ((mm) ۴/۱±۰/۵). وارنیش کمترین MIC و MBC را در هر دو گونه باکتریایی به ثبت رساند. در مهار رشد استرپتوکوکوس موتانس، PSE و وارنیش عملکردی مشابه داشتند (P=۰/۵۸۸)؛ در حالی که اثرهای سینرژیستی چشمگیری در استفاده هم زمان از دو عصاره مشاهده شد (P<۰/۰۵).

استنتاج: وارنیش نسبت به سایر گروه های مورد مطالعه دارای اثرهای سودمندتری بود و برای مهار رشد دو گونه باکتریایی به غلظت کمتری از آن نیاز است. با این حال می توان از غلظت های بالای PSE، با و بدون وارنیش فلوراید در برابر استرپتوکوکوس موتانس بهره برد.

واژه های کلیدی: استرپتوکوکوس موتانس، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، عصاره دانه انار، وارنیش فلوراید، *Punica granatum*

مقدمه

می شود: میزبان، محیط و باکتری ها. امروزه، نقش گونه های باکتریایی پوسیدگی زا در شیوع و بروز

پوسیدگی دندان عارضه ای چندعاملی و مولتی فاکتوریال است که از تعامل سه عامل اصلی ایجاد

E-mail: banafsheh.soleimani@yahoo.com

موفق مسئول: بنفشه سلیمانی - ساری: دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده دندان پزشکی

۱. مرکز تحقیقات دندان پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. دانشیار، گروه کودکان، دانشکده دندان پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. دانشیار، گروه میکروبی شناسی و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۴. استادیار، گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۵. دندان پزشک، ساری، ایران

۶. استادیار، گروه آمار زیستی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۷. متخصص دندان پزشکی اطفال، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۳/۱۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۲/۵/۱ تاریخ تصویب: ۱۴۰۲/۸/۱۷

پوسیدگی دندان به خوبی مشخص شده است. استرپتوکوکوس موتانس مهم ترین گونه باکتریایی است که با متابولیسم قندها و تولید اسید، با گذشت زمان، سبب دمیترالیزه شدن بافت های دندان و آغاز فرایند پوسیدگی می شود (۱). لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس موجود در ضایعات پوسیدگی نیز در پیشرفت پوسیدگی ها نقشی مهم دارد (۲). امروزه، محققان بر این باورند که کنترل پوسیدگی های اولیه و توقف دمیترالیزاسیون مینایی با مهار تشکیل پلاک و فاکتورهای محافظتی بزاق ممکن خواهد بود (۳). استفاده از وارنیش فلوراید می تواند سبب جلوگیری، کاهش سرعت و نیز توقف پوسیدگی های دندان شود. فلوراید معدنی موجود در وارنیش فلوراید دمیترالیزاسیون مینای دندان را متوقف می کند و ریمینرالیزاسیون دندان را افزایش می دهد (۴). Minimally Invasive (MI) Varnish یک روش درمانی Bioavailable است که حاوی کلسیم، فسفات و فلوراید است. این محصول بیش تر از سایر وارنیش های فلوراید بر سطوح دندان باقی می ماند و حاوی مقادیر زیادی فلوراید و کلسیم آزاد شده در حفره دهان است (۵). وارنیش ها برای مدت طولانی تری به سطح دندان می چسبند و مانع از دست رفتن فوری آن می شوند؛ بنابراین، به عنوان مخازن آزاد کننده آهسته عمل می کنند (۶).

مقاومت میکروارگانیسم ها در برابر آنتی بیوتیک های معمول استفاده شونده برای درمان عفونت های دهانی (نظیر پنی سیلین ها و سفالوسپورین ها، اریترومایسین، تتراسایکلین و مشتقات آن و نیز مترونیدازول)، لزوم شناسایی استراتژی های مؤثر و نوین علیه عوامل بیماری زای دهان را ضروری می کند (۷). در دهه های گذشته، استفاده از گیاهان دارویی با اثرهای پیشگیرانه و درمانی که به مراقبت های بهداشتی کمک می کنند، به طور چشمگیری افزایش یافته است. پژوهشگران برای یافتن اثربخشی احتمالی آن ها در جلوگیری از تشکیل پلاک دندان، بسیاری از

محصولات گیاهی را بررسی کرده اند (۷، ۸). عصاره های این گیاهان دارویی اغلب به علت خواص ضد باکتریایی یا کاهش دادن چسبندگی عوامل بیماری زای میکروبی به سطوح دندان، از ایجاد بیوفیلم های باکتریایی جلوگیری می کنند (۹)؛ با این حال، فقط تعداد کمی از محصولات طبیعی کاربردهای درمانی پیدا کرده اند. دلایل این استفاده محدود به عوامل مختلفی از جمله اثربخشی، پایداری، بو، طعم و هزینه برمی گردد (۱۰). انار (*Punica granatum L.*) بومی مناطق شمال هند تا ایران است و از *Lythraceae*، در منطقه مدیترانه کشت و برداشت می شده است (۱۱). بهره گیری از خواص دارویی انار پیشینه ای طولانی دارد؛ با این حال، در دهه های اخیر، علاقه به ارزیابی اثرهای درمانی انار به طور محسوسی افزایش یافته است (۱۲، ۱۳). انار گیاهی دارویی با پتانسیل آنتی اکسیدانی و خواص ضد التهابی است و در درمان سرطان، بیماری های قلبی و عروقی، دیابت و ضایعات دهان و دندان از آن استفاده کرده اند. اثرهای درمانی درخور توجه انار را می توان با ترکیبات بیوشیمیایی نظیر فلاونوئیدها، آنتوسیانیدین ها و الایزیتانین ها مرتبط دانست (۱۴).

El-Sharkawy و همکاران اثرگذاری چشمگیر مصرف دهان شویه های حاوی عصاره پوست انار و نیز آب انار تازه را در کاهش کلونی های استرپتوکوکوس موتانس حاضر در بزاق بیماران (به ترتیب با ۱۰۰ و ۹۹/۷۵ درصد کاهش) گزارش کرده اند (۱۵).

در مطالعه Kote و همکاران نیز مصرف دهان شویه آب انار سبب کاهش چشمگیر تعداد کلونی های استرپتوکوکی و لاکتوباسیلی در پلاک های دندان بیماران در مقایسه با پیش از مداخله شد (۱۶). اگرچه وارنیش فلوراید هم چنان از عوامل مؤثر در پیشگیری از پوسیدگی به شمار می رود، مصرف آن در بیماران مبتلا به فلوروزیس و نیز بیماران مبتلا به اختلالات کلیوی توصیه نمی شود (۱۷). از طرف دیگر، پژوهش های پیشین

تأثیر شایسته توجه استفاده هم‌زمان از عصاره‌های گیاهی مختلف را به همراه وارنیش MI بر باکتری‌های پوسیدگی‌زای دندانی نشان داده‌اند (۱۸)؛ لذا، مطالعه حاضر با هدف مقایسه خواص ضد میکروبی عصاره دانه انار (PSE) با وارنیش فلوراید MI و نیز بررسی اثر سینرژسم احتمالی آن‌ها بر باکتری‌های پوسیدگی‌زای دندان (استرپتوکوکوس موتانس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس) صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی و آزمایشگاهی (in vitro) با کد اخلاق IR.MAZUMS.REC.1400.460 در سال ۱۴۰۰، به تصویب کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی مازندران رسید و سپس، مراحل آن اجرا شد. ابتدا، گیاه تازه فصل پاییز (از یک نوع) از بازار معتبر تهیه شد و متخصص سیستماتیک واریته آن (انار شیرین) را مشخص کرد. سپس، نمونه هرباریومی از آن تهیه و برای آن، شماره هرباریومی تنظیم شد. پس از آن، پوست خارجی و پالپ میوه جدا شد و دانه‌های آریل دار میوه شسته شدند و برای مراحل بعد، از آن‌ها استفاده شد. بعد از این مرحله، با فشردن، آریل‌ها حذف و دانه‌ها در دمای ۴۰ درجه در خشک‌کن، به صورت کامل، خشک شدند. سپس، دانه‌ها تا اندازه مدنظر (۲۰۰ مش) پودر شدند و در ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد، در پرکولاتور، به مدت ۲۴ ساعت، خیسانده شدند. پس از اتمام روند عصاره‌گیری، عصاره‌ها صاف شدند و در خلأ، با دستگاه روتاری تغلیظ و با دستگاه فریزدرایر خشک شدند. عصاره‌های به دست آمده از نظر فنل و فلاوونوئید تام استانداردسازی شدند.

مقادیر تام ترکیبات فنولیک با استفاده از روش فولین سیوکالتیو تعیین شدند. در این مرحله، ۱ میلی‌لیتر از محلول ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتری عصاره با ۱ میلی‌لیتر محلول ۳ برابر رقیق شده واکنشگر فولین ترکیب و به لوله آزمایش منتقل شد. سپس، برای مدت ۵ دقیقه، در

دمای اتاق و محلی تاریک انکوبه شد و ۱ میلی‌لیتر محلول ۱۰ درصد (W/W) سدیم کربنات به آن اضافه و برای مدت ۶۰ دقیقه، در دمای اتاق انکوبه شد. در نهایت، در طول موج ۷۶۵ نانومتر و با دستگاه اسپکتروفوتومتر، جذب آن خوانده شد. هم‌چنین، منحنی کالیبراسیون با استفاده از مقادیر استاندارد گالیک اسید و با اجرای پروسه قبلی برای گالیک اسید تهیه و تنظیم و مقدار تام ترکیبات فنولیک تعیین شد. این مراحل برای عصاره تا ۳ بار تکرار و نتایج به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد گزارش شد (۲۳-۱۹). هم‌چنین، به عنوان بلانک از محلولی استفاده شد که از ابتدا، بدون عصاره و حاوی بقیه اجزای واکنش باشد. مقادیر تام ترکیبات فلاوونوئیدی در عصاره تهیه شده با روش اسپکتروفوتومتریک آلومینیم کلرید تعیین شد. در این مرحله، ۱ میلی‌لیتر محلول ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتری عصاره با ۱ میلی‌لیتر محلول ۲ درصد آلومینیم کلرید در لوله آزمایش ترکیب و ۱/۵ میلی‌لیتر محلول ۵۰ گرم بر لیتری سدیم استات به آن‌ها افزوده شد و محلول حاصل به مدت ۲/۵ ساعت، در دمای اتاق و شرایط تاریک، انکوبه شد. در نهایت، در طول موج ۴۴۰ نانومتر و با دستگاه اسپکتروفوتومتر، جذب آن تعیین شد. هم‌چنین، منحنی کالیبراسیون با استفاده از مقادیر استاندارد کوئرستین و با اجرای پروسه قبلی برای آن، تهیه و تنظیم و مقدار تام فلاوونوئیدها تعیین شد. این مراحل برای هر عصاره تا ۳ بار تکرار و نتایج به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد گزارش شد (۲۱-۱۹). هم‌چنین، به عنوان بلانک از محلولی استفاده شد که از ابتدا، بدون عصاره و حاوی بقیه اجزای واکنش باشد.

بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره‌ها در آزمایش دیسک دیفیوژن

دو سوبه باکتری در این مطالعه بررسی شدند

Streptococcus mutans ATCC 35668 و

Lactobacillus acidophilus ATCC 4356 که به

در این مطالعه، از میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای U شکل استریل استفاده شده است. ابتدا، ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون برات برای استریپتوکوکوس موتانس و MRS برات حاوی سیستمین برای لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس به تمام چاهک‌ها اضافه شد. سپس، رقت‌های سریالی از PSE، وارنیش فلوراید و ترکیب این دو در چاهک‌های میکروپلیت تهیه شد. میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای U شکل دارای ۸ ردیف و ۱۲ ستون است. ستون‌های ۱ تا ۱۰ حاوی غلظت‌های مختلف ماده مدنظر و سوسپانسیون میکروبی بود و ستون ۱۱ به عنوان کنترل منفی، تنها حاوی محیط کشت و عصاره یا وارنیش یا ترکیب این دو و ستون ۱۲ به عنوان کنترل مثبت، حاوی محیط کشت و سوسپانسیون میکروبی بود.

بدین صورت که ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از PSE با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به چاهک اول اضافه شد و سپس، غلظت‌های مختلف تا ۹ شماره رقت، به چاهک دوم تا چاهک آخر (۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۳۱۲، ۰/۱۵۶ و...) ریخته شد. در مرحله بعد، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند ۱/۱۰۰ رقیق شده باکتری مدنظر به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد که در این حالت، تعداد باکتری‌ها در هر چاهک معادل 10^5 CFU/mL خواهد بود. در نهایت، میکروپلیت‌ها به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در شرایط مساعد هر باکتری (شرایط بی‌هوازی برای لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس و CO_2 ۱۰ درصد برای رشد استریپتوکوکوس موتانس) انکوبه شدند. با بررسی چشمی کدورت ایجاد شده در چاهک‌ها، کم‌ترین رقت از ماده مدنظر که در چاهک مربوط به آن رقت کدورتی مشاهده نمی‌شد، به عنوان میزان MIC در نظر گرفته شد. هم‌چنین، از پودر اریترومايسين و آمپی‌سیلین به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (۲۹-۲۷، ۱۸، ۲۰). به منظور تأیید یافته‌های مطالعه، تمامی مراحل ۵ بار تکرار شدند (۱۸).

ترتیب، روی محیط‌های کشت میتیس سالیواریوس آگار و MRS agar (مرک، آلمان) کشت داده شدند. هر دو محیط کشت به مدت ۴۸ ساعت، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. فعالیت‌های ضد باکتریایی عصاره‌های متانولی گیاهان مختلف با استفاده از روش انتشار دیسک، طبق روش استاندارد انجام شد (۲۴، ۲۵). این تست طبق توصیه مؤسسه استاندارد بالینی و آزمایشگاهی با استفاده از روش دیسک آگار دیفیوژن انجام شد (۲۶). کلونی‌های کشت داده شده هر دو باکتری در سرم فیزیولوژیک حل شد و کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند (معادل 10^8 CFU/mL) تهیه شد. سپس، ۵ گروه تعیین شدند: G1: عصاره دانه انار (PSE)؛ G2: ترکیب وارنیش MI و PSE؛ G3: وارنیش MI (V-Varnish، Vericom، Korea)؛ G4: کنترل مثبت (اریترومايسين و آمپی‌سیلین (سیگما، آلمان))؛ G5: کنترل منفی (آب مقطر).

کدورت ۰/۵ مک فارلند از هر سویه باکتریایی به طور جداگانه، با استفاده از یک سواب استریل، به صفحات آگار مولر هینتون تلقیح شد. تمام دیسک‌های کاغذی استریل روی سطح آگار تلقیح شده مولر هینتون قرار گرفتند. سپس، به مقدار ۲۰ میکرولیتر از هر یک از غلظت‌های تهیه شده از عصاره و وارنیش بر دیسک‌ها تلقیح شدند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، انکوبه شدند و فعالیت ضد باکتریایی هر عصاره با اندازه‌گیری قطر منطقه مهار (میلی‌متر) بیان شد. این آزمایش برای اطمینان از سازگاری ۳ بار تکرار شد.

بررسی حداقل غلظت مهاری عصاره‌ها (Minimum Inhibitory Concentration (MIC))

به منظور تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) عصاره دانه انار و وارنیش فلوراید و ترکیب آن دو، از روش Micro Broth Dilution استفاده شد.

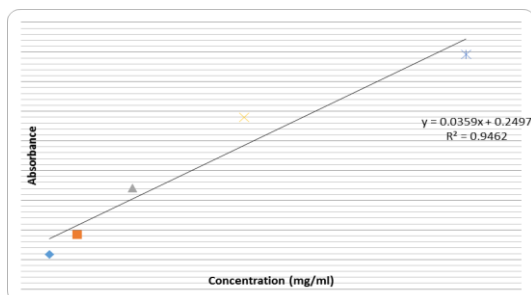
بررسی حداقل غلظت کشندگی عصاره‌ها (Minimum Bactericidal Concentration (MBC))

برای اجرای تست حداقل غلظت کشندگی (MBC)، از اولین چاهکی که هیچ رشدی از ارگانیسیم مدنظر را نشان نداده بود و ۳ تا ۴ چاهک بعدی، ۱۰ میکرولیتر نمونه برداشته و در محیط کشت بلاد آگار، کشت داده شد. نمونه‌ای که هیچ رشدی نشان نداد، حداقل غلظت کشندگی در نظر گرفته شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای توصیف داده‌ها از شاخص‌های میانگین، انحراف معیار، درصد، جدول‌ها و نمودارهای مناسب استفاده شد. توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون‌های کولمگروف اسمیرنوف و شاپیروویلیک بررسی شد و با توجه به توزیع داده‌ها، برای مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری در گروه‌های مختلف، از آزمون تحلیل واریانس (ANOVA) و آزمون تعقیبی بونفرونی استفاده شد. برای تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS 22 استفاده شد و مقادیر $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

صورت کلی، میانگین قطر هاله باکتری استرپتوکوکوس موتانس در آزمون دیسک دیفیوژن در گروه‌ها متفاوت و دارای اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.001$). به همین دلیل، از آزمون تعقیبی بونفرونی برای مقایسه دوه‌دو میانگین گروه‌ها استفاده شد. در جدول شماره ۱، مقایسه دوه‌دو گروه‌ها از نظر میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری استرپتوکوکوس موتانس، با استفاده از آزمون تعقیبی گزارش شد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، هاله مهار رشد این باکتری در عصاره سینرژیسیم انار و وارنیش با هر دو گروه اختلاف معنی‌داری داشت ($P < 0.05$)؛ اما اختلاف معنی‌داری بین دو گروه دانه انار و وارنیش مشاهده نشد ($P = 0.588$).



نمودار شماره ۱: منحنی استاندارد ترکیب گالیک اسید

جدول شماره ۱: مقایسه دوه‌دو گروه‌های حاوی عصاره‌های ضد باکتری‌های دهانی، از نظر میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری استرپتوکوکوس موتانس با استفاده از آزمون تعقیبی

عصاره	عصاره دانه انار	وارنیش	ترکیب عصاره دانه انار و وارنیش
عصاره دانه انار	-	۰.۵۸۸	< ۰.۰۰۱
وارنیش	-	-	۰.۰۰۴
ترکیب عصاره دانه انار و وارنیش	-	-	-

میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در کل آزمایش‌ها برابر با 9.33 ± 4.08 بود. میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در PSE، وارنیش، ترکیب PSE و وارنیش به ترتیب، 4.0 ± 1.58 ، 12.0 ± 1.22 و 12.0 ± 1.0 گزارش شد. نتایج آزمون تحلیل واریانس نشان داد که به صورت کلی، میانگین قطر هاله مهار رشد باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در آزمون دیسک دیفیوژن

یافته‌ها

نتایج آزمایش فولین سیوکالتیو

میزان فنل گیاه انار معادل 286.5 ± 25.6 میلی گرم گالیک اسید در ۱۰۰ گرم گیاه محاسبه شد. منحنی کالیبراسیون در نمودار شماره ۱ شرح داده شده است.

نتایج آزمون دیسک دیفیوژن

میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری استرپتوکوکوس موتانس در کل آزمایش‌ها برابر با 9.67 ± 2.06 بود. میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری استرپتوکوکوس موتانس در عصاره‌های دانه انار، وارنیش و ترکیب انار و وارنیش به ترتیب، 8.0 ± 1.0 ، 9.0 ± 1.22 و 12.0 ± 0.22 گزارش شد. نتایج آزمون تحلیل واریانس نشان داد که به

در گروه‌ها متفاوت و دارای اختلاف معنی دار است ($P < 0/001$). به همین دلیل، از آزمون تعقیبی برای مقایسه دوبه‌دو میانگین قطر هاله مهار رشد گروه‌ها استفاده شد. در جدول شماره ۲، مقایسه‌های دوبه‌دو گروه‌ها از نظر میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، با استفاده از آزمون تعقیبی بونفرونی گزارش شد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، هاله مهار رشد این باکتری در PSE، با هر دو گروه اختلاف معنی داری داشت ($P < 0/05$)؛ اما اختلاف معنی داری بین دو گروه وارنیش و سینرژیسیم PSE و وارنیش مشاهده نشد ($P > 0/999$).

نتایج حداقل غلظت مهاری و کشندگی عصاره‌ها

با توجه به جدول شماره ۳، بیش‌ترین حداقل غلظت مهاری و کشندگی در هر دو گونه باکتریایی مربوط به PSE بود و کم‌ترین غلظت مهاری و کشندگی نیز در هر دو گونه متعلق به وارنیش بود.

جدول شماره ۲: مقایسه دوبه‌دو گروه‌های حاوی عصاره‌های ضد باکتری‌های دهانی، از نظر میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس با استفاده از آزمون تعقیبی

عصاره	عصاره دانه انار	وارنیش	ترکیب عصاره دانه انار و وارنیش
دانه انار	-	$< 0/001$	$< 0/001$
وارنیش	-	-	$> 0/999$
ترکیب عصاره دانه انار و وارنیش	-	-	-

جدول شماره ۳: حداقل غلظت مهاری و کشندگی در باکتری‌های استرپتوکوکوس موتانس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در عصاره‌های مختلف ضد باکتری‌های دهانی (بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر)

عصاره	استرپتوکوکوس موتانس		لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	
	MBC	MIC	MBC	MIC
عصاره دانه انار	۶۵۰	۷۸۱/۲۵	۱۲۵۰۰	۱۵۶۲/۲۵
وارنیش	۹۷/۶۵	۲۴/۴۱	۳۹۰/۶۲	۹۷/۶۵
ترکیب عصاره دانه انار و وارنیش	۳۹۰/۶۲	۹۷/۶۵	۲۵۶۲/۵	۱۹۵/۳۱

بحث

در مطالعه حاضر که با هدف مقایسه اثرهای آنتی‌میکروبیال عصاره دانه انار با وارنیش فلوراید علیه استرپتوکوکوس موتانس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس انجام گرفت، مقایسه قطر هاله‌های عدم رشد عصاره‌ها

نشان داد که وارنیش فلوراید بیش از PSE سبب مهار رشد هر دو گونه باکتریایی مورد مطالعه شده است. از نگاه آماری، تفاوت قطر هاله عدم رشد در دو عصاره مذکور در گونه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس چشمگیر گزارش شد، در حالی که برتری آماری چشمگیری میان دو عصاره در استرپتوکوکوس موتانس دیده نشد. هم‌چنین، PSE در هر دو گونه باکتریایی، با تشکیل هاله ای سبب مهار رشد کلونی‌ها شده بود. با این حال، قطر هاله مهار رشد در استرپتوکوکوس موتانس بیش‌تر بود. Vahid-Dastjerdi و همکاران کاهش بیان ژن‌های گلیکوزیل ترانسفراز موجود در استرپتوکوکوس موتانس در محیطی حاوی عصاره گل انار را نسبت به گروه کنترل گزارش کردند (۳۰). از آن‌جا که گلیکوزیل ترانسفراز از آنزیم‌های مهم در تشکیل بیوفیلم باکتریایی به شمار می‌رود، مطالعه ایشان استفاده از محصولات حاوی عصاره‌های طبیعی انار را به عنوان ضد پلاک پیشنهاد می‌کرد (۳۰). مطالعه حاضر نیز اثر ضد میکروبی گیاه انار علیه این گونه باکتریایی را تأیید می‌کند. Hajifattahi و همکاران در مطالعه خود، به بررسی خواص آنتی‌باکتریال عصاره هیدروالکلیک انار علیه میکروارگانسیم‌های شایع دهانی پرداختند (۳۱). بررسی قطر هاله عدم رشد باکتری‌های گوناگون در مطالعه ایشان نیز اثرهای آنتی‌باکتریال درخور توجه عصاره انار را علیه استرپتوکوکوس موتانس نشان داد. Subramaniam و همکاران نیز تشکیل هاله مهار رشد را در تمامی غلظت‌های مورد مطالعه خود علیه استرپتوکوکوس موتانس گزارش کردند (۱۴).

یافته‌های این دو مطالعه هم‌سو با نتایج مطالعه حاضر است. در پژوهش Satta و همکاران نیز اثرهای آب انار علیه استرپتوکوکوس موتانس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس مطالعه شد (۳۲). نتایج آزمون دیسک دیفیوژن نشان داد که آب انار در غلظت‌هایی به جز ۱۰ درصد، در تمامی نمونه‌های استرپتوکوکوس موتانس، باعث ایجاد هاله‌های مهار رشد شده بود. این در حالی بود که در ۲ نمونه

از ۷ نمونه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس هیچ هاله رشدی شکل نگرفته بود و به طور میانگین، قطر هاله در این گونه کم تر از استرپتوکوکوس موتانس گزارش شد. این نتایج نیز هم سو با مطالعه حاضر بود و به نظر می رسد که خواص مهاری انار بر استرپتوکوکوس موتانس چشمگیر تر از لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس باشد.

در مطالعه حاضر، مقادیر حداقل غلظت مهاری (MIC) در برابر استرپتوکوکوس موتانس در گروه های PSE، وارنیش MI و ترکیب دو عصاره، به ترتیب ۷۸۱/۲۵، ۲۴/۴۱ و ۹۷/۶۵ میکروگرم بر میلی لیتر مشاهده شد. حداقل غلظت کشندگی (MBC) در برابر استرپتوکوکوس موتانس نیز در گروه های PSE، وارنیش MI و گروه ترکیب، به ترتیب ۶۲۵۰، ۹۷/۶۵ و ۳۹۰/۶۲ میکروگرم بر میلی لیتر مشاهده شد. MIC و MBC در گروه PSE، بیش تر از سایر گروه ها بود و وارنیش MI به تنهایی دارای حداقل MIC و MBC بود. لذا، وارنیش فلورايد در مقایسه با PSE در غلظت های پایین تری بر استرپتوکوکوس موتانس اثر گذار است. Ferrazzano و همکاران با بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره های هیدروالکلیک پوست و آب انار در برابر استرپتوکوکوس موتانس، MIC و MBC عصاره آب انار را به ترتیب، ۲۵۰۰۰ و ۴۰۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش کردند، در حالی که MIC و MBC عصاره پوست انار به ترتیب، ۱۰۰۰۰ و ۱۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به ثبت رسید (۳۳).

Hajifattahi و همکاران نیز MIC و MBC عصاره گلبرگ گیاه انار را ۳۹۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش کردند (۳۱). این دو مطالعه از نقطه نظر اثرهای مهاری و کشندگی گیاه انار بر استرپتوکوکوس موتانس با مطالعه حاضر هم سو هستند. با این حال، اختلاف در مقادیر MIC و MBC می تواند به دلیل استفاده از مواد مؤثر مختلف انار باشد. در مطالعه حاضر، از عصاره دانه انار استفاده شد و مقادیر بسیار پایین تری نیز برای MIC و MBC در برابر استرپتوکوکوس موتانس گزارش شد.

Vahid-Dastjerdi و همکاران نیز MIC عصاره گل انار علیه این گونه باکتریایی را ۵۰۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش کرده اند که بسیار بالاتر از مطالعه حاضر است (۳۴). با مقایسه مطالعه حاضر با پژوهش های فوق، به نظر می رسد که عصاره دانه انار خواص آنتی باکتریال بالاتری را نسبت به دیگر محصولات گیاه انار علیه استرپتوکوکوس موتانس داشته باشد. با این حال، در مطالعه Gulube و همکاران، MBC عصاره پوست میوه انار علیه این باکتری ۶۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر به ثبت رسید و عصاره خام پوست انار و PSE نتایج مشابهی در MBC نشان دادند (۳۵).

در مطالعه حاضر، مقادیر MIC در برابر لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در گروه های PSE، وارنیش MI و گروه ترکیب دو عصاره، به ترتیب ۱۵۶۲/۲۵، ۹۷/۶۵ و ۱۹۵/۳۱ میکروگرم بر میلی لیتر مشاهده شد. مقادیر MBC در برابر لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس نیز در گروه های PSE، وارنیش MI و گروه ترکیب، به ترتیب ۱۲۵۰۰، ۳۹۰/۶۲ و ۱۵۶۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر مشاهده شد. هم چون استرپتوکوکوس موتانس، در لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس نیز MIC و MBC در گروه PSE، بیش از سایر گروه ها بود و وارنیش به تنهایی دارای کم ترین MIC و MBC بود. حداقل غلظت مهاری و کشندگی عصاره های گیاه انار در برابر این گونه باکتریایی تا کنون در هیچ پژوهشی بررسی نشده است و لذا، امکان مقایسه یافته های این پژوهش با مطالعات دیگر وجود ندارد. با این حال، غلظت های ثبت شده می تواند نشان دهنده اثر گذاری مهاری و کشندگی بالاتر عصاره های مورد مطالعه در غلظت های یکسان علیه استرپتوکوکوس موتانس نسبت به لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس باشد. یافته هایی مشابه در مطالعات Mittal و همکاران (۳۶) و Satta و همکاران (۳۲) نیز به ثبت رسیده است. به نظر می رسد پژوهش ها به منظور یافتن عصاره ای مؤثر بر لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، بایستی درباره دیگر گیاهان دارویی صورت گیرد.

فوق العاده وارنیش فلوراید بر دو گونه باکتریایی مهم (لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و استرپتوکوکوس موتانس) در پوسیدگی‌های دندانی بود؛ با این حال، با توجه به محدودیت‌های استفاده از آن، به نظر می‌رسد که از غلظت‌های بالای PSE می‌توان به عنوان جایگزینی مناسب برای فلوراید در برابر استرپتوکوکوس موتانس استفاده کرد. در مطالعه حاضر، عصاره دانه انار عملکرد ضعیفی را در برابر لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به ثبت رساند؛ با این حال، به نظر می‌رسد که اثرهای سینرژیستی مطلوبی در مصرف هم‌زمان وارنیش فلوراید و این عصاره علیه استرپتوکوکوس موتانس وجود داشته باشد.

مطالعه آزمایشگاهی حاضر هم‌چون تمامی پژوهش‌های *in-vitro*، بدون در نظر گرفتن شرایط و متغیرهای تأثیرگذار بالینی مانند تغذیه، رعایت بهداشت، اسیدیته، حجم، خاصیت بافری و غلظت بزاق، اثرهای باکتری‌های موجود در فلور نرمال و نیز دیگر میکروارگانیسم‌های پوسیدگی‌زای کلونیزه شونده در حفره‌ی دهانی انجام گرفت؛ لذا، با توجه به یافته‌های این مطالعه و خواص آنتی‌باکتریال درخور توجه عصاره دانه انار علیه استرپتوکوکوس موتانس و نیز اثرهای هم‌افزایی آن در ترکیب با وارنیش فلوراید، توصیه می‌شود که پژوهش‌هایی بالینی هم‌راستا با این مطالعه صورت گیرد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان‌نامه دانشجویی مصوب از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران و با کد اخلاق IR.MAZUMS.REC.1400.460 است. بدین وسیله، از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تشکر به عمل می‌آید.

در این مطالعه، ترکیب وارنیش فلوراید و PSE به صورت چشمگیری، سبب افزایش قطر هاله عدم رشد استرپتوکوکوس موتانس نسبت به گروه وارنیش فلوراید شد. با این حال، قطر هاله گروه وارنیش و گروه ترکیب دو عصاره تفاوتی در لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس نداشتند. هم‌چنین، افزودن PSE به وارنیش در هر دو گونه، سبب افزایش اندک در MIC و MBC نسبت به گروه وارنیش شد. امروزه، در دندان‌پزشکی پیشگیرانه، به اثرهای ضد پوسیدگی فلوراید که ناشی از مهار دیمیرالیزاسیون و تحریک ریمینرالیزاسیون پوسیدگی‌های اولیه است، بسیار توجه می‌شود (۳۷). V وارنیش استفاده شده در مطالعه حاضر، حاوی قند زایلیتول و CPP-ACP (نوعی پروتئین استخراج شده از شیر که به یون‌های کلسیم و فسفات متصل شده است) بود. زایلیتول عاملی مؤثر بر مهار رشد استرپتوکوکوس موتانس حفره دهان است. CPP-ACP نیز تقویت‌کننده چسبندگی یون‌های کلسیم و فلوراید در محیط دهان است و ریمینرالیزاسیون پوسیدگی‌های اولیه را سرعت می‌بخشد (۳۸). گیاه انار بومی فلات ایران است و از دیرباز، گیاهی مهم در طب سنتی ایرانی به شمار می‌رود (۳۹). مصرف محصولات انار و نیز نوشیدن آب انار برای بهبود سلامت دهان و دندان، سابقه‌ای دیرینه دارد (۴۰). امروزه، پژوهشگران فلاونوئیدهای پلی‌فنولیک را مسئول خواص آنتی‌باکتریال، ضد التهاب و آنتی‌اکسیدانی این گیاه می‌دانند (۴۰). فلاونوئیدها با کاهش قابل توجه فعالیت آنزیم‌های آسپاراتات آمینوترانسفراز و آلفا گلوکوزیداز و نیز افزایش فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی سرولوپلاسمین، نقش بسزایی در افزایش سلامت دهان، دندان و بافت‌های پریدنتال ایفا می‌کنند (۴۰).

یافته‌های این مطالعه تأیید کننده اثرگذاری

References

- Vijayakumar A, Sarveswari HB, Vasudevan S, Shanmugam K, Solomon AP, Neelakantan P. Baicalein Inhibits Streptococcus mutans Biofilms and Dental Caries-Related

- Virulence Phenotypes. *Antibiotics* 2021; 10(2): 215.
2. Hashem ZS, Hashem AS. An in vitro study on the antifungal and antibiofilm activities of probiotic bacteria against *Candida* species isolated from orthodontic appliances and dental caries. *Nov Res Microb J* 2021; 5(2): 1176-93.
 3. Delimont NM, Carlson BN. Prevention of dental caries by grape seed extract supplementation: A systematic review. *Nutr Health* 2020; 26(1): 43-52.
 4. Bijle MN, Ekambaram M, Lo EC, Yiu CKY. The enamel remineralization potential of fluoride varnishes containing arginine. *J Dent* 2020; 99: 103411.
 5. Cochrane NJ, Shen P, Yuan Y, Reynolds EC. Ion release from calcium and fluoride containing dental varnishes. *Aust Dent J* 2014; 59(1): 100-5.
 6. Baik A, Alamoudi N, El-Housseiny A, Altuwirqi A. Fluoride varnishes for preventing occlusal dental caries: A review. *Dent J* 2021; 9(6): 64.
 7. Jain I, Jain P, Bisht D, Sharma A, Srivastava B, Gupta N. Comparative evaluation of antibacterial efficacy of six Indian plant extracts against *Streptococcus mutans*. *J Clin Diagn Res* 2015; 9(2): ZC50-ZC3.
 8. Ferrazzano GF, Amato I, Ingenito A, Zarrelli A, Pinto G, Pollio A. Plant polyphenols and their anti-cariogenic properties: a review. *Molecules* 2011; 16(2): 1486-507.
 9. Tahmourespour A, Aminzadeh A, Salehifard I. Anti-adherence and anti-bacterial activities of *Pistacia atlantica* resin extract against strongly adherent *Streptococcus mutans* strains. *Dent Res J* 2022; 19: 36.
 10. Ferrazzano GF, Roberto L, Catania MR, Chiaviello A, De Natale A, Roscetto E, et al. Screening and scoring of antimicrobial and biological activities of Italian vulnerary plants against major oral pathogenic bacteria. *Evid Based Complementary Altern Med* 2013; 2013: 1-10.
 11. Prasad D, Kunnaiah R. *Punica granatum*: A review on its potential role in treating periodontal disease. *J Indian Soc Periodontol* 2014; 18(4): 428-32.
 12. Howell AB, D'Souza DH. The pomegranate: effects on bacteria and viruses that influence human health. *Evid Based Complementary Altern Med* 2013; 2013: 1-11.
 13. Ismail T, Sestili P, Akhtar S. Pomegranate peel and fruit extracts: a review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. *J Ethnopharmacol* 2012; 143(2): 397-405.
 14. Subramaniam P, Dwivedi S, Uma E, Babu KG. Effect of pomegranate and aloe vera extract on *Streptococcus mutans*: An in vitro study. *Dent Hypotheses* 2012; 3(3): 99-105.
 15. El-Sharkawy MS. Evaluation of the antimicrobial effect of pomegranate extract on *Streptococcus mutans*. *Al-Azhar Dent J Girls* 2019; 6(4): 467-73.
 16. Kote S, Kote S, Nagesh L. Effect of pomegranate juice on dental plaque microorganisms (*Streptococci* and *Lactobacilli*). *Anc Sci Life* 2011; 31(2): 49-51.
 17. Abuzenada BM, Souror YR, Waly AS, Abo Khalifa YH. *Mutans streptococci* growth on glass ionomer incorporated with chlorhexidine: in-vivo study. *Braz dent sci* 2020; 23(2): 1-7.
 18. Elgamily H, Safy R, Makharita R. Influence of Medicinal Plant Extracts on the Growth of Oral Pathogens *Streptococcus Mutans* and *Lactobacillus Acidophilus*: An In-Vitro Study. *Open Access Maced J Med Sci* 2019; 7(14): 2328-2334.
 19. Swadas M, Dave B, Vyas SM, Shah N.

- Evaluation and comparison of the antibacterial activity against *Streptococcus mutans* of grape seed extract at different concentrations with chlorhexidine gluconate: An in vitro study. *Int J Clin Pediatr Dent* 2016; 9(3): 181-185.
20. Mirkarimi M, Amin-Marashi SM, Bargrizan M, Abtahi A, Fooladi I, Ali A. The antimicrobial activity of grape seed extract against two important oral pathogens. *Zahedan J Res Med Sci* 2013; 15(1): 43-6.
 21. Mousavi F, Shirzadi Karamolah K, Mahmoudi H. Antimicrobial Effect of Extracts of *Daphne Oleoides* on Bacteria Isolated from Dental Plaque. *J Mashhad Dent Sch* 2019; 43(4): 387-400 (Persian).
 22. Shafiee F, Khoshvishkaie E, Davoodi A, Dashti Kalantar A, Bakhshi Jouybari H, Ataei R. The determination of blood glucose lowering and metabolic effects of *Mespilus germanica* L. hydroacetic extract on streptozocin-induced diabetic Balb/c mice. *Medicines* 2018; 5(1): 1.
 23. Fakhri M, Davoodi A, Parviz M, Sadeghi Ghadi Z, Mousavinasab SN, Farhadi R, et al. Characterization and HPLC analysis of manna from some *Cotoneaster* species. *Int J Pharm Sci Res* 2017; 8(12): 5360-66.
 24. Bauer A. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am J clin pathol* 1966; 45(4): 149-58.
 25. Zaidan M, Noor Rain A, Badrul A, Adlin A, Norazah A, Zakiah I. In vitro screening of five local medicinal plants for antibacterial activity using disc diffusion method. *Trop biomed* 2005; 22(2): 165-170.
 26. Wayne P. Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *Inform Suppl* 2011; 31(1): 100-121.
 27. Zarei M, Rajabnia M, Moghadammia AA, Khafri S, Khodadadi E. Effect of different *Vitis vinifera* seed extracts on *Lactobacillus acidophilus* and *casei* bacteria. *Caspian J Dent Res* 2021; 10(1): 42-47.
 28. Smullen J, Koutsou G, Foster H, Zumbé A, Storey D. The antibacterial activity of plant extracts containing polyphenols against *Streptococcus mutans*. *Caries res* 2007; 41(5): 342-349.
 29. Fakhri E. Evaluation of antimicrobial efficacy of grape seed extract and Nd: YAG against persistent endodontic pathogens: Tabriz University of Medical Sciences, School of dentistry 2018.
 30. Vahid-Dastjerdi E, Monadi E, Khalighi HR, Torshabi M. Down-regulation of glycosyl transferase genes in *Streptococcus mutans* by *Punica granatum* L. flower and *Rhus coriaria* L. fruit water extracts. *Iran J Pharm Res* 2016; 15(2): 513-519.
 31. Hajifattahi F, Moravej-Salehi E, Taheri M, Mahboubi A, Kamalinejad M. Antibacterial effect of hydroalcoholic extract of *Punica granatum* Linn. petal on common oral microorganisms. *Int J Biomater* 2016; 2016: 8098943.
 32. Satta BOA, Hasan AM, Khashman BM, Hafeadh HA-H. Study of Antimicrobial Activity to Pomegranate Juice Against Some of Dental Pathogenes. *J Coll Basic Educ* 2013; 19(72).
 33. Ferrazzano GF, Scioscia E, Sateriale D, Pastore G, Colicchio R, Pagliuca C, et al. In vitro antibacterial activity of pomegranate juice and peel extracts on cariogenic bacteria. *BioMed res int* 2017; 2017: 2152749.
 34. Vahid-Dastjerdi E, Abdolazimi Z, Ghazanfarian M, Amdjadi P, Kamalinejad M, Mahboubi A. Effect of *Punica granatum* L. flower water

- extract on five common oral bacteria and bacterial biofilm formation on orthodontic wire. *Iran J public health* 2014; 43(12): 1688-1694.
35. Gulube Z, Patel M. Effect of Punica granatum on the virulence factors of cariogenic bacteria Streptococcus mutans. *Microb Pathog* 2016; 98 : 45-49.
36. Mittal S, Hiregoudar M, Subramaniam R, Muralikrishna K, Sakeenabi B, Prashant G, et al. Effect of three herbal extracts against Streptococcus mutansobacillus acidophilus in comparison to Chlorhexidine. *J Indian Assoc Public Health Dent* 2011; 9(Suppl 1): S336-S40.
37. Jullien S. Prophylaxis of caries with fluoride for children under five years. *BMC Pediatr* 2021; 21(1): 1-11.
38. Attiguppe P, Malik N, Ballal S, Naik SV. CPP-ACP and fluoride: a synergism to combat caries. *Int J Clin Pediatr Dent* 2019; 12(2): 120.
39. Kiany F, Niknahad H, Niknahad M. Assessing the effect of pomegranate fruit seed extract mouthwash on dental plaque and gingival inflammation. *J Dent Res Rev* 2016; 3(4).
40. Narayan T, Deshpande S, Jha A, Ramprasad V. Punica granatum (Pomegranate) fruit and its relevance in oral hygiene. *J Dent Med Sci* 2014; 13(8): 29-34.